

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)



REC'D	27 MAR 2000
WIPO	PCT

ESV

EPO - Munich
62

24. Feb. 2000

Bescheinigung

Die ROCHE DIAGNOSTICS GMBH in Mannheim/Deutschland hat eine Patentanmeldung
unter der Bezeichnung

"Verfahren zur Herstellung endotoxinfreier oder an
Endotoxin angereicherter Nukleinsäuren und deren
Verwendung"

am 29. Januar 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

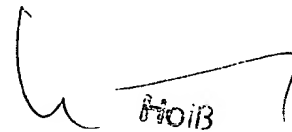
Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole
C 07 H und G 01 N der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 15. Februar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag


Hoib

Aktenzeichen: 199 03 507.5

Verfahren zur Herstellung endotoxinfreier oder an Endotoxin abgereicherter Nukleinsäuren und deren Verwendung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden aus einer biologischen Probe, Verwendung der isolierten bzw. gereinigten Nukleinsäure bzw. Oligonukleotide zur Transfektion von Zellen sowie zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen, eine für das Isolierungs- bzw. Reinigungsverfahren geeignete Zusammensetzung sowie die Verwendung von Kaliumacetat und ein Silicagel-ähnliches Trägermaterial zur Isolierung von endotoxinfreier oder an Endotoxin abgereicherter Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden.

Die Qualität isolierter Nukleinsäuren gewinnt zunehmend an Bedeutung. Hochreine Nukleinsäure-Fractionen, d.h. von denen möglichst sämtliche anderen Zellbestandteile, wie beispielsweise Endotoxine abgetrennt sind, spielen eine zentrale Rolle in der Gentherapie bzw. bei der Transfektion von Zellen eukaryontischen oder auch prokaryontischen Ursprungs. Demzufolge wurden in den vergangenen Jahren vermehrt Verfahren bzw. Maßnahmen publiziert, die die Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischem Probenmaterial mit hohem Reinheitsgrad erlauben. Im wesentlichen kommen bei den bekannten Verfahren der Einsatz von Affinitäts- und/oder Anionenchromatographie-Materialien sowie nicht ionische Detergenzien oder auch verdünnte Lösungen höherer Alkohole zum Einsatz. Beispielsweise werden gemäß WO95/21177 die interessierenden Fraktionen einer Affinitätschromatographie oder einer Chromatographie an anorganischer Festphase, letzteres bevorzugt in Gegenwart eines nicht ionischen Detergenzes, zur Entfernung von Endotoxinen unterzogen und anschließend mittels Anionenaustauscherchromatographie weiter gereinigt. Ein solches zweistufiges Chromatographie-Verfahren ist jedoch zeit- und materialaufwendig und daher mehr von akademischem Wert. Nach einem anderen Verfahren (WO95/21178) ist ebenfalls zwingend eine aufwendige Anionenaustauscherchromatographie erforderlich, um Rückstände zuvor zugesetzter komplexer Salzlösung abzutrennen.

Darüber hinaus ist seit längerem bekannt, daß DNA-Plasmide aus komplexen biologischen Proben eukaryontischen oder prokaryontischen Ursprungs durch die Bindung an Silicagel in Ge-

genwart chaotroper Salze, wie beispielsweise Guanidiniumhydrochlorid isoliert werden können (M.A. Marko et al., *Analyt. Biochem.* 121, (1982) 382-287; EP 0 389 063). Diese Verfahren sind jedoch nicht für die Gewinnung endotoxinarmer bzw. endotoxinfreier Nukleinsäurefraktionen geeignet. So konnte beispielsweise gezeigt werden, daß die Maßnahmen gemäß Marko et al. (1982) zu einem Endotoxingehalt von mehr als 10.000 U pro µg DNA führen. Eine solche endotoxinreiche DNA-Fraktion ist für die Transfektion von Zellen bei gentherapeutischen Anwendungen nicht geeignet.

Der Erfindung lag daher die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Herstellung von endotoxinfreien bzw. an Endotoxin abgereicherten Nukleinsäuren zur Verfügung zu stellen, wodurch die Nachteile bekannter Verfahren, wie insbesondere aufwendige Säulenmaterialien, vermieden werden.

Die Aufgabe wird gelöst durch ein Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden aus biologischen Proben, wobei die jeweilige biologische Probe aufgeschlossen wird, dabei nicht gelöste Zell-Bestandteile in einer wäßrigen Kaliumacetat-Lösung resuspendiert, gegebenenfalls vorhandene unlösliche Bestandteile, beispielsweise durch Zentrifugation, abtrennt, die flüssige Phase mit einer ein Detergenz enthaltenden Alkohol-Lösung vermischt und inkubiert werden. Die Lösung wird anschließend mit einem Silicagel-ähnlichem Trägermaterial in Kontakt gebracht, die wäßrige Phase wird möglichst quantitativ von dem die Nukleinsäuren bzw. Oligonukleotide bindendem Trägermaterial abgetrennt – beispielsweise durch Absaugen oder Zentrifugieren – und das Trägermaterial mit der DNA wird anschließend ausreichend gewaschen. Als Waschlösung kann eine Alkohol-Lösung oder – was sich als besonders vorteilhaft herausgestellt hat – Aceton verwendet werden. Abhängig von dem Volumen der Ausgangsprobe ist eine Inkubationszeit für den Kontakt mit dem Trägermaterial von 10 bis maximal 40 Minuten bei Raumtemperatur ausreichend; erfindungsgemäß reichen in der Regel ca. 20 Minuten aus.

Dem Fachmann sind Silicagel-ähnliche Trägermaterialien prinzipiell bekannt. Erfindungsgemäß hat sich insbesondere eine Suspension von Siliciumdioxid als geeignet erwiesen. Eine Siliciumoxid-Suspension, welche durch Zugabe von Säure (z. B. Salzsäure) zu einer wäßrigen Suspension von Siliciumdioxid hergestellt und anschließend autoklaviert wurde, ist für das erfindungsgemäße Verfahren besonders geeignet.

Die wäßrige Kaliumacetat-Lösung enthält Kaliumacetat bevorzugt in einem Konzentrationsbereich von ca. 1 bis 6 mol/l, wobei ein Bereich von 2 bis 4 mol/l und ein schwach saurer pH-Wert (ca. pH 4.5-6.8) erfindungsgemäß zu einer besonders hohen Qualität der Nukleinsäuren geführt hat.

Eine weitere vorteilhafte Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, wenn der Probe nach Zugabe der Kaliumacetat-Lösung zusätzlich ein oder mehrere RNA-verdauende Enzyme, wie beispielsweise RNase A und/oder RNase T1, zugesetzt werden. Es hat sich insbesondere bei größeren Präparationen als vorteilhaft erwiesen, wenn das bzw. die RNA-verdauende(n) Enzym(e) im gleichen Medium/Puffer zugegeben wird, in dem zuvor das Kaliumacetat-Salz zugesetzt wurde. Alternativ, und zwar gilt dies insbesondere bei kleineren Ansätzen, können die RNA-verdauenden Enzyme auch bereits während des Aufschließens der biologischen Probe, d.h. zusammen mit dem Lyse-Puffer (z. B. zusammen mit Puffer P1 in Beispiel 1.2), zugegeben werden. Werden mehrere RNA-verdauende Enzyme zugesetzt, können diese in beliebigen Verhältnissen oder auch zu gleichen Teilen vorhanden sein. Die Endkonzentration an RNA-verdauenden Enzymen in dieser Lösung beträgt in der Regel bis bzw. um ca. 150 µg/ml; aber auch höhere Enzymkonzentrationen haben das erfindungsgemäße Verfahren nicht nachteilig beeinflusst.

In der Regel ist erfindungsgemäß bereits eine Inkubation für den Enzymverdau von 5 bis 10 Minuten bei 4°C, gegebenenfalls zunächst bei Raumtemperatur, mit der Kaliumacetat-Lösung ausreichend; abhängig von der Menge des eingesetzten Probenmaterials kann jedoch auch entsprechend länger inkubiert werden.

Erfindungsgemäß geeignete Alkohol-Lösungen sind insbesondere hochprozentige Lösungen höherer Alkohole, wie Isopropanol. Besonders vorteilhaft hat sich erfindungsgemäß erwiesen, wenn die Alkohol-Lösung nicht mit Wasser verdünnt ist, also nahezu zu 100% aus dem jeweiligen Alkohol besteht und zusätzlich ein oder mehrere ionische Detergenzien, und zwar in einer Konzentration von 0,5 bis 10% (w/v) enthält. Eine 100% Isopropanol-Lösung, welche ca. 1 bis 4% (w/v) SDS enthält, hat sich erfindungsgemäß als besonders geeignet erwiesen.

Der Aufschluß bzw. die Vorreinigung der biologischen Probe kann prinzipiell nach dem Fachmann bekannten Verfahren erfolgen. Alkalische Lysemaßnahmen sind erfindungsgemäß, insbesondere bei bakteriellen Wirtszellen, bevorzugt. Auf diese Weise können Proteinkomponenten und andere lösliche Bestandteile entfernt werden, bevor der Rückstand, der im wesentlichen Nu-

kleinsäurekomponenten und andere nicht lösliche Zellbestandteile enthält, mit der Kaliumacetat- bzw. Alkohol/Detergenz-Lösung in Kontakt gebracht wird.

Mit dem erfindungsgemäßen Verfahren können Nukleinsäuren, wie beispielsweise Plasmid-DNA in hoher Qualität gewonnen werden, d.h. insbesondere mit einem Endotoxin-Gehalt von weniger als 100 U/ μ g DNA, in der Regel von maximal 10 U/ μ g DNA.

Insbesondere ist als überraschend anzusehen, daß die DNA nach alkalischer Lyse, ohne daß – wie im Stand der Technik beschrieben – die Zugabe chaotroper Substanzen erforderlich ist, mit hoher Effizienz an die Adsorptionsmatrix gebunden werden kann. Die Abwesenheit zugesetzter chaotroper Substanzen führt zu erheblichen Verbesserungen und Vereinfachungen bei der anschließenden Aufreinigungsprozedur der DNA bzw. der entsprechenden Transfektion von Zielzellen, und zwar sowohl bei Zellen eukaryontischen als auch prokaryontischen Ursprungs.

Darüber hinaus sind die nach dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen endotoxinfreien bzw. an Endotoxin abgereicherten Nukleinsäuren bzw. Oligonukleotide zur Herstellung von Mitteln zur Behandlung von genetisch bedingten Krankheiten geeignet.

Ein weiterer Aspekt der Erfindung sind Mittel bzw. Zusammensetzungen zur Gewinnung von Plasmid-DNA aus entsprechenden Wirtszellen, bei denen es sich beispielsweise um Mikrotiterplatten oder Blöcke handelt, die gegebenenfalls Minisäulen zur Aufreinigung der Plasmid-DNA enthalten können.

Die erfindungsgemäßen Zusammensetzungen enthalten im wesentlichen eine wäßrige Kaliumacetat-Lösung sowie eine ein Detergenz enthaltende Alkohol-Lösung und ein Silicagel-ähnliches Trägermaterial. Darüber hinaus ist vorteilhaft, wenn eine für den Aufschluß einer biologischen Probe geeignete Lösung, insbesondere für die alkalische Lyse, vorhanden ist. Bevorzugte Ausführungsformen der Zusammensetzung sind, wenn die Kaliumacetat-Lösung das Salz in einem Konzentrationsbereich von ca. 1 bis 6 M, besonders bevorzugt von ca. 2 bis 4 M in einem schwach sauren Medium (pH ca. 4.5-6.8) aufweist, die Alkohol-Lösung Isopropanol mit ca. 0,5 bis 10% (w/v) eines ionischen Detergenzes, wie beispielsweise SDS enthält und/oder es sich bei dem Trägermaterial um eine wäßrige Suspension von Siliciumdioxid handelt.

Abbildung 1

Endotoxin(Lipopolysaccharid, LPS)-Gehalt in verschiedenen DNA-Plasmid-Fraktionen nach Aceton-Waschung ((c), (d)) und SDS-Fällung ((b), (d)). Die Plasmid-DNA wurde durch Bindung an Siliciumoxid isoliert und anschließend mit Isopropanol ((a), (b)) oder Aceton ((c), (d)) gewaschen, mit oder ohne LPS-Fällung in Gegenwart von SDS (2,5% in Isopropanol). Der LPS-Gehalt wurde colorimetrisch bestimmt, nach den Angaben des Herstellers (Boehringer Ingelheim, Deutschland).

- (a) Isopropanol/ohne SDS,
- (b) Isopropanol/mit SDS,
- (c) Aceton/ohne SDS,
- (d) Aceton/mit SDS

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung weiter:

1.1 Zellkultur und Transfektion

Babyhamster Nierenzellen (BHK) wurden in DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium) ergänzt mit 5% fötalem Kälberserum (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer befeuchteten 5% CO₂-Atmosphäre kultiviert. Für Transfektionen wurden die Zellen in 24-Loch-Platten gegeben und mit 2 µg Plasmid-DNA nach der Calciumphosphat-Coppräzipitationsmethode wie von Roussel et al. (Mol. Cell. Biol. 4 (1984), 1999-2009) beschrieben transfiziert. Hierfür wurden 25 µl DNA Lösung mit 25 µl 2 x HBS: 274 mM NaCl, 10 mM KCl, 40 mM HEPES, 1.4 mM Na₂PO₄, pH 6,9 bei 4°C in einer 96-Loch-Platte mit einem 12-Kanal-Pipettierautomaten (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) vermischt. Nach Zugabe von 20 µl einer 0,25 M CaCl₂-Lösung (4°C) und Mischen wurden 38 µl nach Inkubation für 25 min bei Raumtemperatur auf die Zellen gegeben.

Entsprechende Aliquots wurden in Löchern von 96-Loch-Blöcken (Qiagen, Hilden, Deutschland) in 900 µl TB-Medium inokuliert und für ca. 30 Stunden unter Schütteln bei 300 Upm kultiviert (37°C). Nach Identifizierung eines positiven Pools wurde die DNA zur Bestätigung des Ergebnisses erneut transfiziert. Die verbleibende DNA wurde zur Transformation von Bakterien für eine Plasmidisolierung im großen Maßstab verwendet.

1.2 Plasmidisolierung mit Säulen

96-Loch-Blöcke (Qiagen, Hilden, Deutschland) mit Bakterien wurden für 5 min bei 3000 g (Sigma Zentrifugen, Osterode am Harz, Deutschland) zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und die Blöcke wurden für 2 bis 3 min umgekehrt auf saugfähiges Papiertuch gebracht. Dann wurden 170 µl Puffer P1 (50 mM Tris-HCl/10 mM EDTA pH 8,0, 4°C) zugegeben und die Bakterienpellets wurden durch vollständige Vortexbehandlung für 10 bis 20 min resuspendiert. Nach Zugabe von 170 µl Puffer P2 (200 mM NaOH, 1% SDS) wurde der Block mit Folie abgedichtet, umgedreht und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Lyse wurde durch Zugabe von 170 µl von 4°C kaltem Puffer P3 (3 M Kaliumacetat pH 5,5, 4°C) beendet. Dann wurden 10 µl RnaseA-Lösung (1,7 mg/ml) zugegeben, für 5 min bei Raumtemperatur und dann bei -20°C inkubiert und erneut für 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in neue Blöcke dekantiert und 100 µl Puffer P4 (2,5% (w/v) SDS in Isopropanol) wurden zugegeben. Der Block wurde einer Vortexbehandlung für 5 min unterzogen und zuerst für 15 min bei 4°C und dann für 15 min bei 20°C inkubiert. Die Blöcke wurden für 10 min bei 6000 Upm zentrifugiert und der Überstand wurde in eine Anordnung von 96 Säulen (Qiagen) in entsprechend zugeschnittene 96-Loch-Platten hergestellt worden war. Diese Platten wurden in Vakuumkammern (Qiagen) gestellt. Dann wurden 150 µl Siliciumoxid-Suspension zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert (die Siliciumoxid-Suspension wurde hergestellt durch Zugabe von 150 µl HCl (37%) zu 250 ml einer Suspension von 50 mg/ml SiO₂ (Sigma) und anschließendes Autoklavieren).

Nach Anlegen von Vakuum wurden die Säulen zweimal mit 600 µl Aceton (-20°C) gewaschen. Die 96-Loch-Säulenplatte wurde auf eine 96-Loch-Mikrotiterplatte gegeben und für 4 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Die Säulenplatte wurde zuerst für 5 min bei 37°C und dann für 5 min in einer Vakuumkammer getrocknet. Dann wurde sie auf eine weitere Mikrotiterplatte gestellt. 70 µl bidestilliertes H₂O (60°C) wurden zugegeben und dann erfolgte eine Zentrifugation für 3 min bei 6000 Upm. Die Mikrotiterplatte wurde bei -20°C aufbewahrt.

1.3 Plasmidisolierung ohne Säulen

Das Verfahren erfolgte bis zur Zugabe des Puffers P4 wie unter Punkt 1.2 beschrieben. Dann wurde der Überstand nach Zentrifugation für 10 min bei 6000 Upm in 96-Loch-POM-Mikroti-

terblöcke (POM=Polyoxymethlen) gegeben, 150 µl Siliciumoxid-Suspension wurden zugegeben und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Platten wurden für 5 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde sorgfältig dekantiert und 400 µl Aceton (-20°C) wurden zugegeben. Die Platten wurden erneut einer Vortexbehandlung (30 sec) unterzogen und für 3 min bei 6000 Upm zentrifugiert. Dieser Acetonwaschvorgang wurde einmal wiederholt. Die Platten wurden zuerst bei Raumtemperatur für 5 min und dann für 5 min in einer Vakuumkammer getrocknet. Die Pellets wurden in 75 µl Wasser (60°C) resuspendiert und bei 6000 Upm und 4°C 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in einer 96-Loch-Mikrotiterplate bei -20°C aufbewahrt.

2. Ergebnisse

Aus den Bakterienkulturen wurde Plasmid-DNA unter Verwendung von Minisäulen (s. Punkt 1.2) isoliert. Ein entsprechendes Protokoll ohne Säulen ist unter Punkt 1.3 beschrieben.

Für den Transfektionsschritt ist es wichtig, Plasmid-DNA sehr hoher Reinheit zu erhalten. Hierzu wurde Siliciumdioxid als Bindematrix für Plasmid-DNA verwendet. Die Bindung von DNA and Siliciumdioxid in Anwesenheit chaotroper Substanzen ist bekannt (Vogelstein und Gillespie, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 (1979), 615-619). Überraschenderweise wurde jedoch festgestellt, daß selbst in Abwesenheit einer zugefügten chaotropen Substanz wie etwa Guanidinhydrochlorid die Plasmid-DNA mit ausreichender Kapazität an Siliciumdioxid bindet. Nach anschließendem Waschen in Aceton, gegebenenfalls unter Zusatz von SDS, konnte Plasmid-DNA in hervorragender Qualität – entsprechend einer Reinigung über einen Cäsiumchloridgradienten – erhalten werden. Üblicherweise wurden etwa 10 µg Plasmid-DNA aus 900 µl LB-Medium mit einer OD_{260/280} von mehr als 1,8 erhalten, wovon 90% in der supercoiled Form vorlagen.

3. Vergleich mit dem Stand der Technik

Versuch A: Bakterienkultur: *E.coli* HB101 pCMVbetaSportGAL, OD₆₈₀/ml ca. 3.3

Es wurden in einem Doppelansatz je 1,8 ml Bakterienkultur mit dem High Pure Plasmid Isolation Kit (Boehringer Mannheim, Cat. No. 1 754 777), welcher ein glasartiges Trägermaterial und ein stark chaotropes Salz enthält, aufgearbeitet und je 1,8 ml Bakterienkultur gemäß dem erfindungsgemäßen Verfahren prozessiert.

Das Ergebnis stellt sich wie folgt dar:

Ausbeute OD _{260nm} :	Endotoxin-Gehalt (LAL Test)
High Pure 1 : 9,0 µg/100 µl endotoxinfreies Wasser	214 EU/µg Plasmid
High Pure 2 : 8,6 µg/100 µl endotoxinfreies Wasser	240 EU/µg Plasmid
Erfindung 1: 11,00 µg/100 µl endotoxinfreies Wasser	1,41 EU/µg Plasmid
Erfindung 2: 10,35 µg/100 µl endotoxinfreies Wasser	4,65 EU/µg Plasmid

Vorgehen gemäß des erfindungsgemäßen Verfahrens mit High Pure Filter Tube:

Die Bakterienkultur wurde für 30 sec. bei 13000 upm zentrifugiert und Überstand abgenommen.

Das Zellsediment von 1.8 ml Bakterienkultur wurde wie folgt weiterbehandelt:

1. Resuspendieren in 250 µl 50 mM Tris-HCl/10 mM EDTA, 100 µg RNase (DNase frei), pH 8.0, 4°C.
2. 250 µl 0.2 M NaOH, 1% SDS zugeben und das Gefäß 5-10 x invertieren, 5 min. bei RT.
3. 250 µl 3 M K-Acetat, pH 5.5 zugeben (4°C) und das Gefäß 5-10 x invertieren, 5 min. auf Eis inkubieren.
4. 10 min. bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugieren (14000 rpm), Überstand abnehmen und 0,2 vol. (ca. 150 µl) 2.5% SDS in Isopropanol (z. B. 7 ml Isopropanol und 1 ml 20% SDS) zugeben und kurz vortexen, 15 min. bei 4°C inkubieren und anschließend 15 min. bei -20°C inkubieren.
5. 10 min. bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugieren (14000 upm), Überstand abnehmen.
6. Überstand in High Pure Filter Tube pipettieren und 20 min. bei RT inkubieren.

7. 30 sec. bei maximaler Geschwindigkeit in einer Tischzentrifuge zentrifugieren (14000 upm), Durchlauf verwerfen und Filter Tube 2 x mit 700 µl eiskaltem Aceton waschen (Zwischen den Waschschritten 30 sec. bei 14000 upm zentrifugieren).
8. Nach dem letzten Waschschrift nochmals 30 sec. bei 14000 upm zentrifugieren, um das Vlies zu trocknen.
9. DNA durch Zugabe von 100 µl endotoxinfreiem Wasser und Inkubation für 10 min. bei RT eluieren. Um die DNA zu gewinnen wird 30-60 sec. bei voller Zentrifugationsgeschwindigkeit zentrifugiert.

Versuch B: Bakterienkultur: *E.coli* JM109pCMVbetaSportGal OD₅₈₀/ml 2.37

Probe	Methode	Modifikation	Ausbeute [µg/100µg]	Endotoxin [EU/µg]
1 und 2	High Pure		9,3 / 9,3	371,7
3 und 4	High Pure	20 min. auf Vlies inkubiert 10 min. vor Elution inku- biert	12,8 / 12, 2	2,18
5 und 6	Erfindung	Ohne Inkubatio- nen	12,2 / 12,6	0,63

Ergebnis:

- Das erfindungsgemäße Verfahren zeigt eine ca. 100fache Reduktion des Endotoxinwertes.
- Ferner führt das erfindungsgemäße Verfahren mit schneller Durchzentrifugation zur gleichen Ausbeute wie mit Inkubation auf Vlies, damit kann die Zeit der Reinigung nun mit ca. 70 min. angegeben werden. Das erfindungsgemäße Verfahren mit schneller Durchzentrifugation zeigt darüber hinaus einen niedrigeren Endotoxinwert als nach der Inkubation auf Vlies.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden aus einer biologischen Probe, dadurch gekennzeichnet, daß
 - die biologische Probe aufgeschlossen, Proteinkomponenten und andere unlösliche Bestandteile abgetrennt werden,
 - zum Rückstand eine wäßrige Lösung an Kaliumacetat gegeben wird und nicht lösliche Bestandteile abgetrennt werden,
 - die mit Kaliumacetat versetzte Lösung mit einer ein Detergenz enthaltenden Alkohol-Lösung vermischt und inkubiert wird,
 - der erhaltene Überstand mit einem Silicagel-ähnlichen Trägermaterial in Kontakt gebracht und inkubiert wird, und
 - aus der löslichen Fraktion die gereinigten Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotide isoliert werden.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß es sich bei der Alkohol-Lösung um eine Mischung von Isopropanol mit einem ionischen Detergenz handelt.
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß die Alkohol-Lösung ein oder mehrere ionische Detergenzien in einer Konzentration von 0,5 bis 10% (w/v) in 100%igem Alkohol enthält.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß eine wäßrige Lösung, die 1 bis 6 M Kaliumacetat enthält, verwendet wird.
5. Verfahren nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die Lösung 2 bis 4 M Kaliumacetat enthält.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß als Silicagel-ähnliches Trägermaterial eine Suspension von Siliciumdioxid eingesetzt wird.
7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 6, dadurch gekennzeichnet, daß das Silicagel-ähnliche Trägermaterial mit Aceton nachgewaschen wird.

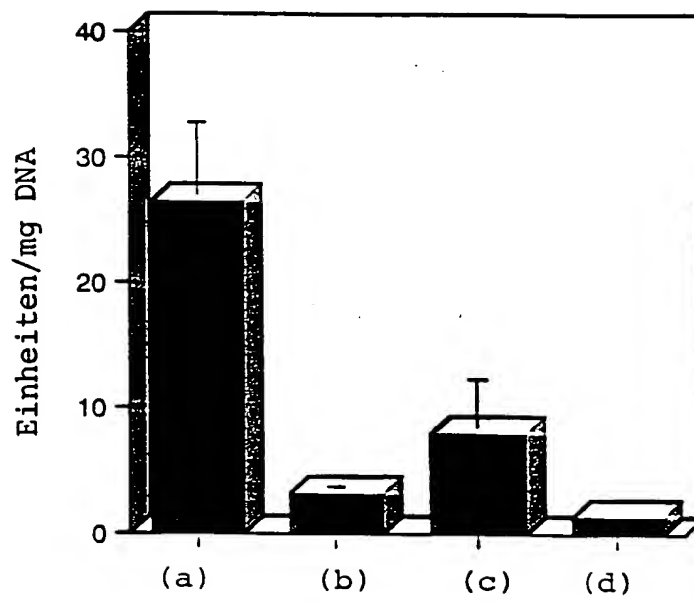
8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß Plasmid-DNA mit einem Endotoxin-Gehalt von weniger als 100 U/ μ g erhalten wird.
9. Verfahren nach Anspruch 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Endotoxin-Gehalt maximal 10 U/ μ g Plasmid-DNA beträgt.
10. Endotoxinfreie oder an Endotoxin abgereicherte Nukleinsäuren bzw. Oligonukleotide erhältlich nach einem Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 9.
11. Verwendung von nach einem der Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 9 gewonnenen Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden zur Transfektion von eukaryontischen oder prokaryontischen Zellen.
12. Verwendung von einer nach einem der Verfahren gemäß der Ansprüche 1 bis 9 gewonnenen Nukleinsäure und/oder Oligonukleotiden zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen.
13. Zusammensetzung enthaltend folgende Komponenten:
 - mindestens eine für den Aufschluß einer biologischen Probe geeignete Lösung,
 - eine wäßrige Kaliumacetat-Lösung,
 - eine Detergenz/Alkohol-Lösung, und
 - ein Silicagel-ähnliches Trägermaterial.
14. Zusammensetzung nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß folgende Komponenten enthalten sind:
 - eine für die alkalische Lyse von biologischem Probenmaterial geeignete Lösung,
 - eine Salz-Lösung, die 1 bis 6 M Kaliumacetat enthält,
 - eine Alkohol-Lösung enthaltend 0,5 bis 10% (w/v) SDS in 100%igem Isopropanol und
 - ein Silicagel-ähnliches Trägermaterial.
15. Zusammensetzung nach Anspruch 13 oder 14, dadurch gekennzeichnet, daß eine Suspension von Siliciumdioxid als Trägermaterial enthalten ist.

16. Verwendung von Kaliumacetat zur Isolierung, Reinigung und/oder Trennung von endotoxinfreier oder an Endotoxin angereicherter Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden aus bzw. von einer vorgereinigten biologischen Probe.

Zusammenfassung

Verfahren zur Isolierung und Reinigung von Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden aus einer biologischen Probe, Verwendung der isolierten bzw. gereinigten Nukleinsäure bzw. Oligonukleotide zur Transfektion von Zellen sowie zur Herstellung eines Mittels zur Behandlung von genetisch bedingten Erkrankungen, eine für das Isolierungs- bzw. Reinigungsverfahren geeignete Zusammensetzung sowie die Verwendung von Kaliumacetat und ein Silicagel-ähnliches Trägermaterial zur Isolierung von endotoxinfreier oder an Endotoxin angereicherter Nukleinsäuren und/oder Oligonukleotiden.

Abbildung 1



THIS PAGE BLANK (USPTO)